

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PAT-NO: JP405317030A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 05317030 A
TITLE: BIOCHEMICAL REACTOR USING MICROCHAMBER
PUBN-DATE: December 3, 1993

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
FUJITA, TAKESHI	
UMEMURA, SHINICHIRO	
UCHIDA, NORITAKA	

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
HITACHI LTD N/A	

APPL-NO: JP04128543
APPL-DATE: May 21, 1992

INT-CL (IPC): C12M001/00 , C12M001/32 , C12M001/36 , F25B021/02 , H01L035/28
H01L035/28

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain an apparatus used for new biological and biochemical analyses enabling the simultaneous treatment of a trace amount of a sample under various reactional conditions, e.g. a microchamber apparatus for carrying out the biological polymeric reaction represented by a DNA or a protein and a method for its utilization and production.

CONSTITUTION: The biochemical reactor has many arranged chambers having $\leq 1.2\text{mm} \times 1.2\text{mm}$ opening area or $\leq 1.4\text{mm}$ depth and a temperature controlling function enabling the independent control in each chamber. Many holes are formed in a silicon wafer according to a semiconductor process and semiconductor Peltier elements (101 to 105) are formed in the interior thereof. The temperature can independently be controlled by controlling the applied voltage for each chamber.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-317030

(43)公開日 平成5年(1993)12月3日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C12M 1/00	A			
1/32				
1/36				
F25B 21/02	B	8919-3L		
H01L 35/28	Z	9276-4M		

審査請求 未請求 請求項の数7(全5頁)

(21)出願番号 特願平4-128543

(22)出願日 平成4年(1992)5月21日

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 藤田 毅

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

(72)発明者 梅村 晋一郎

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

(72)発明者 内田 憲孝

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

(74)代理人 弁理士 小川 勝男

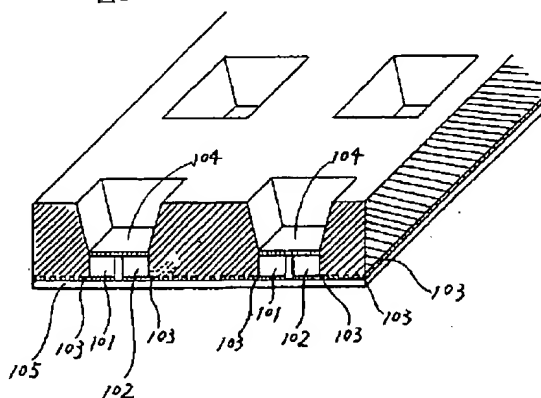
(54)【発明の名称】 マイクロチャンバを用いた生化学反応装置

(57)【要約】

【目的】極微量のサンプルを様々な反応条件で同時に処理することが可能となる新規な生物学および生化学的分析に供する装置、例えばDNAや蛋白質に代表される生体高分子反応を行なうマイクロマルチチャンバ装置およびその利用方法、製造方法の提案

【構成】開口部面積1.2mm×1.2mm以下、もしくは深さ1.4mm以下のチャンバを多数配列し、各々のチャンバ内に独立に制御することの可能な温度調節機能を有する生化学反応装置。シリコンウェハに半導体プロセスにより多数の孔と、その内部に半導体バルティエ素子(101~105)を形成する。チャンバ毎に印加電圧を制御することにより、独立に温度調節可能としたものである。

図1



【特許請求の範囲】

【請求項1】二次元平面上に配列された多数の孔（チャンバ）を持つ生化学反応容器において、各々のチャンバに独立した温度調節が可能な温度調節機能を組み込んだことを特徴とする生化学反応装置。

【請求項2】前記生化学反応容器は12行×8列穴のマイクロタイタープレートであることを特徴とする請求項1記載の生化学反応装置。

【請求項3】前記各チャンバの大きさが、開口部において1.2mm×1.2mm以下の大きさであることを特徴とする請求項1記載の生化学反応装置。

【請求項4】前記各チャンバの大きさが、深さにおいて1.4mm以下の大きさであることを特徴とする請求項1記載の生化学反応装置。

【請求項5】母材をSiウエハとし、反応容器となるチャンバを前記Siウエハの一表面にエッチングにより成形し、チャンバ周囲を酸化することにより、チャンバを熱伝導率の低いSiO₂で囲まれた構造にすることを特徴とする請求項1記載の生化学反応装置。

【請求項6】母材をSiウエハとし、反応容器となるチャンバを前記Siウエハの一表面にエッチングにより成形し、その各チャンバ内に独立したペルティエ素子を配置し、各素子は独立して制御されることを特徴とする請求項1記載の生化学反応装置。

【請求項7】二次元平面上に配列された多数のチャンバを持つ生化学反応容器の、各々のチャンバに独立した温度調節が可能な温度調節機能を組み込んだ生化学反応装置を用いて核酸増幅反応を行うに際し、各チャンバごとに温度及び/または温度を保持する時間を独立に変化させることを特徴とする核酸増幅反応方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は生物学および生化学的分析に供する装置、例えばDNAや蛋白質に代表される生体高分子反応を行なうマイクロマルチチャンバ装置およびその利用方法、製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】多数の生化学的試料を同時に扱うマイクロマルチチャンバとしては、いわゆる12行×8列のマイクロタイタープレートを含むマイクロウエルテストプレートがあり、これに規格を同じくしたハンドリング装置やインキュベータ、遠心装置等の周辺装置も実用化されている。マイクロウエルテストプレートに反応装置として分離膜や機能膜を有するように設計されたマイクロフィルトレーショントレイとしては、特開 平2-187110に見られるように、免疫学的検査やマイクロマトグラフなどを目的とした使い捨ての装置を提供するものがある。

【0003】しかし、現在実用化されているマイクロタイタープレートは単に試料を保持する容器でしかなく、

またマイクロフィルトレーショントレイについても、ウェル毎に独立に反応条件を制御することは非常に困難であり、特に温度調節を独立に行うことは不可能であると考えられる。

【0004】さらにまた、現在市販されているマイクロタイタープレートは、容量が10μl～1mlのオーダーの大きさのチャンバであり、極微量の試料を取り扱うことや高速で温度調節を行うには適していない。

【0005】一方、極微量の試料を扱うマイクロチャンバとしては、特公平2-34597号の“細胞を選別するための装置および方法”や、特開平-131569号の“マイクロチャンバプレートおよび粒子判別法ならびに粒子処理装置および細胞処理装置”がある。これらは細胞一個の大きさを扱うマイクロチャンバを提供し、かつ半導体プロセスによって組み込んだ電極等によって、独立に各チャンバに電圧を印加すること等についての方法および装置を提供しているが、どちらも主に細胞を取り扱うことを目的とするもので、DNAや蛋白質に代表される生体高分子反応を行うには最適とは言えないと考えられる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】生化学反応の主なもの、分離、精製、攪拌混合、インキュベータ（反応温度保持）であり、これらを10³～10⁴個のオーダーで同時に処理できれば、現在の生化学的な仕事のスルーputは飛躍的に向上すると考えられる。例えば、現在癌化と関係する様々な遺伝子およびその変異部位が同定されつつあり、その数は数百種類にも及んでいるが、これらの部位を同時に検査、検出できれば、診断の精度やスルーputは大きく向上する。また遺伝子解析において、10000クローンを超える遺伝子ライブラリのスクリーニングなどを行なう上では、一枚のプレート上に少なくとも1000個以上のチャンバが並んでいることが望ましい。一方、医療診断や腫瘍細胞などの部位特異的発現機構を調べる上では、準備可能な検体試料の量の点から考えると、多数であると同時に微量の試料を取り扱う必要がある。

【0007】また近年発明されたイン ヴिटロ（In vitro）での核酸増幅反応（PCR法）は、反応液の温度制御によって様々な新しい診断手法や実験手法を可能とし、その結果、生化学の研究作業の中でイン ヴिटロで行うことのできる範囲がかなり拡大してきている。この場合に重要となってくるのは、反応液全体の均一かつ高速度な温度制御技術である。

【0008】従って本発明の目的は、まず微量の反応試料を十分な濃度で反応させ得る装置を提供するものである。また、反応液の温度制御をより迅速にかつ均一に行えるようにした装置を提供することにある。

【0009】さらに本発明の他の目的は、チャンバ自体を能動的な反応装置とすることにより、同時に多数の生

化学的試料を取り扱うことを可能とし、また必要に応じて個々の試料について独立に反応条件を設定することを可能とする装置を提供すること、加えてこの装置により可能となる新たなプロトコルの一例を提供するものである。

【0010】また、生化学の反応装置は、時として致命的な影響を与える混合汚染（コンタミネーション）を防ぐために使い捨て可能（ディスポーザブルタイプ）であることが好ましい。そこで、大量生産を可能とし、ディスポーザブルタイプの反応装置を提供することも本発明の目的である。

【0011】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するため、それぞれのチャンバを容量0.5 μ l以下に微小化し、微量の反応液を効率良く取り扱えるようにした。

【0012】また、各チャンバ毎にペルティエ素子により形成されるヒータおよび冷却器を設け、そのヒータおよび冷却器に直接反応液を接触させることにより反応液の温度制御を行なえるようにした。

【0013】加えて、チャンバの加工に半導体プロセスを利用することにより、大量生産を可能とした。

【0014】

【作用】チャンバを微小化し微量の反応液を扱えるようにすることにより、微量の反応試料を十分な濃度で反応させることが可能となる。例えば、0.5 μ lの反応液の中で反応を行わせると、100 μ lの反応液の場合と同濃度の反応を行うためには1/200の量の試料があれば良く、逆に言えば、同じ量の試料で濃度は200倍となる。このことは反応出発試料の微量化だけでなく、酵素等の使用量も少なくすることとなり、低コスト化にもつながると考えられる。

【0015】また、反応液の微量化に加えて各チャンバごとにヒータおよび冷却器を取付け、そのヒータおよび冷却器に直接反応液を接触させることにより、反応チャンバごとに反応液を独立に温度制御し、かつ、その温度制御を迅速に行うことが可能となる。チャンバ母材をシリコンとして、異方性エッチングによってチャンバとなる適当な体積の孔を掘った後、表面のある面に対して、PNPN…からなる半導体ペルティエ素子を形成し、各ペルティエに独立に配線を行い付加電圧を制御することにより、独立に温度制御（加熱も冷却も同一の素子により）が可能となる。また、すべてのチャンバ内加工が終了した後に、チャンバ周囲を酸化することにより、チャンバを熱伝導率の低いSiO₂で囲まれた構造にすることも可能である。

【0016】このようにして作ったチャンバにおいては、ペルティエ素子の吸熱および発熱量の限界は、吸熱時0.15W/mm²、発熱時0.18W/mm²程度と見積もられる。この条件において、酵素反応の開始および終了を精度良く制御するための温度変化の速度を $\Delta 2$

5℃/sec以上とすると、深さは最大でも1.4mm以下である必要がある。

【0017】一方、チャンバ加工を施す面積は、装置の小型化や手に入り易いシリコンウェハの大きさ、加工やハンドリングの容易さから判断して、80mm×80mm以下の大きさの四角形状配列が良いと考えられる。先述のように、今後の遺伝子診断や遺伝子解析に用いる上では、一枚のウェハ上に少なくとも1000個のチャンバが並んでいることが望ましい。この場合80mm×80mmの正形状にチャンバの一边と同じピッチで1000個のチャンバを配列するためには、チャンバの一边は1.2mm以下であることが必要となる。

【0018】ところで、シリコンウェハを異方性エッチングにより加工する場合、開口部形状を正方形とすると、穴形状は正方形錐状となり、その底面と側面のなす角度は約50°である。この形状において、深さをヒト卵細胞（直径約200 μ m）が扱える420 μ mとし、開口部を1.2mm×1.2mmの正方形とするとペルティエ素子を形成する底面は0.6mm×0.6mmの正形状となる。このようにして作ったチャンバにおいては、ペルティエ素子の吸熱および発熱量は、吸熱時0.05W、発熱時0.06W程度と見積もられるが、上記のような開口部1.2mm×1.2mm、深さ0.42mmの場合、体積は最大0.35 μ lとなり $\Delta 25$ ℃/secを満足する。ただし従来の温度調節器は、反応液をいれた反応チューブを恒温槽に装着することによって液温を調節していたので、チューブの熱抵抗やチューブとヒータ間の熱接触なども問題となっていたが、本発明のように加熱もしくは冷却器が直接反応液に接していれば、効果的な温度調節が可能である。

【0019】混合攪拌の点においても、反応液が微量であれば拡散の効果が大きくなる。拡散の速度は、およそ体積と比例関係にあるので、0.5 μ lの反応液中では200 μ lの場合に比べて200倍の速さでランダムな混合が進むと考えられる。チャンバ全体に対して高周波の微小振動を加えることによって、拡散効果を助長することもできる。これだけでは十分といえない場合は、チャンバ内に三次元微細加工によって振動子もしくは回転子を構築する方法をとれば良い。たとえば、薄くしたシリコン板を静電気力によってたわませて、その静電気力をコントロールすることによって、シリコン薄膜を振動させる装置も実現されているが、この構造を利用することが考えられる。また、シリコンウェハ上に多数の静電モータを並べて作ることも可能である。

【0020】これらの加熱および冷却素子や攪拌要素を、半導体プロセスによって各チャンバごとに構築することによって、多数の反応装置が平面上に配列されたマイクロチャンバ装置を提供することが可能である。しかも半導体プロセスによれば、多数のマイクロチャンバを同時に加工することが容易であるので、装置自体をディ

5

スポーザブルにすることも可能となる。

【0021】このような装置を用いることによって、反応温度と反応時間をパラメータとした新しい実験手法が可能となる。例えば、PCR法を行なう場合には、変性温度、再会合温度、伸長温度の3種類の温度とその保持時間が、反応の効率（場合によっては生成産物の有無）を決定する。反応液の微量化により精度よく設定温度を制御し、かつ、反応液ごとに独立な温度制御の行い得る本装置を用いれば、同じ反応液に対して異なる設定温度で同時に反応を行ない、最適な実験条件における産物を迅速に得ることが可能である。またそれだけでなく、DNA配列中の点変異などが、敏感に最適再会合温度に影響することを利用して、遺伝子診断などをより正確に効率よく行なうことも可能となる。加えて本装置では、DNAポリメラーゼによる伸長時間を分解能良く制御することにより、反応生成物の特異性を向上させることも可能である。

【0022】

【実施例】以下、本発明の一実施例を図1～図4により説明する。図1、2は本発明のマイクロチャンバを用いた生化学反応装置、図3は上記装置を要素として組み込んだ自動試料調製装置である。また図1～図4において共通部分の番号は同一とした。

【0023】図1において、装置の母材はシリコンであり、異方性エッチングによってチャンバとなる適当な体積の孔を掘った後、底面に101～105からなる半導体ペルティエ素子が形成されている。101、102は拡散法（半導体プロセス）により形成したP型およびN型半導体、103はリード線、104はヒータおよび冷却プレート（温調プレート）、105は全ウェル共通の定温度接点である。定温度接点105を適当な温度に制御しておき、リード線103の両端に必要な電圧をかけることにより、104に示す温調プレートの温度をウェル毎に独立に制御可能である。また、リード線に電圧をかけず両端の電位差を測定すればこのペルティエ素子を温度計測用の熱電対として使用することも可能である。場合によっては、図2に示すようにウェル加工時に温調部分104と熱電対部分201を別々に形成することも可能である。本実施例においてウェルの大きさは、開口部は縦1.2mm×横1.2mmで深さ0.42mm、シリコン結晶面の特性から、底面は縦0.6mm×横0.6mmとなり、ウェルの容積は最大0.35 μ lとなる。

【0024】温調プレート104としてはペルティエ素子の銅電極をそのまま用いているが、銅電極の反応液に対する影響が重要な場合には、この電極の上をセラミックアルミプレートや熱伝導性の良いポリマ等で覆うことにより対策する。

【0025】またウェルの周囲は酸化されたSiO₂となっており、熱絶縁の効果が母材のシリコンに比べて大

6

きくなるようになっている。

【0026】図3は図1に示したチャンバプレートを組み込んだ自動試料調製装置の鳥瞰図である。マイクロチャンバプレートを用いた反応装置100は台301に固定される。台301は、チャンバプレートの電極のソケットおよび定温度接点の温度制御のための温度調節器より構成されている。ウェル内の拡散の効果を高めるために高周波の振動をチャンバプレートに与えられるような構造にすることもできる。

10 【0027】302はピペッタ303とマイクロチャンバプレート100のふた304を搬送するXYステージである。ピペッタ303はサブマイクロリットルの分注が可能なマイクロキャピラリーを用いたピペットを有し、極微量の試薬およびサンプルを精度よく分注することが可能である。このピペッタが、溶液保存容器305と反応装置100との間を往復しながらウェル内に反応液を供給する。超微量の試薬の供給には、キャピラリーなどのピペットではなく単なる針先を用いる方法もある。すなわち、中空部分を持たず試薬に浸した針先の表面を濡らしている試薬を、針先を反応液に接触させることによって、反応液中に拡散させるのである。試薬の濃度および濡れ面積をコントロールすることにより超微量の試料供給が可能となる。

【0028】ふた304はマイクロチャンバと同様な位置配列に浅い溝の加工をして、上面にペルティエ素子を形成したものである。このふた304は、分注時以外は、ウェルにたいして溝が一致するように押しつけられ（図4）、それぞれのウェルの反応液よりもわずかに（2～3℃）高い温度に制御される。このことによりウェル中の微量反応液の蒸発を防ぐことが可能である。

【0029】この自動試料調製装置は、分離機能膜等の分離要素、さらに多種類の試薬供給要素などと組み合わせることにより、非常に小型大量処理の生化学反応装置を構成し得ると考えられる。また今後の三次元微細加工技術の進歩により、ウェル中に攪拌要素や分離要素を含むチャンバプレートも実現可能であると考えられる。

【0030】本明細書においては、主に1 μ l以下の容量を持つマイクロチャンバプレートについて述べてきたが、本発明の重要項目である、独立した制御の可能な温度調節機能や攪拌、分離機能を各々のチャンバが有する反応装置に関しては、チャンバの大きさが制限を受けるものではなく、いわゆる12行×8列のマイクロタイタープレートに上記のような反応要素を組み込んだ反応装置も、本発明の含む範囲である。

【0031】

【発明の効果】本発明によれば、極微量のサンプルを様々な反応条件で同時に処理することが可能となる。このことにより、従来扱えなかった極微量のサンプルを出発試料とする、生化学反応の最適化、高スループット化を実現し、遺伝子解析や遺伝子診断の分野の発展に寄与で

きる。

【0032】また周辺装置との組合せにより、生化学反応自動装置の小型化を実現する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例のマイクロチャンバプレートを用いた生化学反応装置

【図2】本発明の他の実施例のマイクロチャンバプレートを用いた生化学反応装置

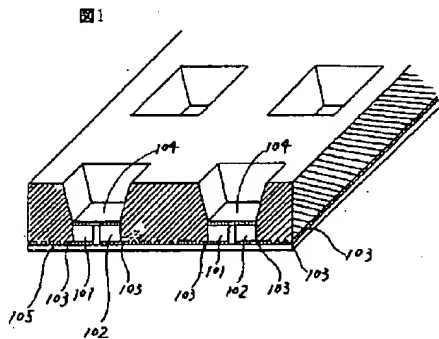
【図3】図1で示した生化学反応装置を組み込んだ自動試料調製装置の一例を示す鳥瞰図

【図4】図3で示した自動試料調製装置において、マイクロチャンバプレートにふた部プレートを装着した状態の図

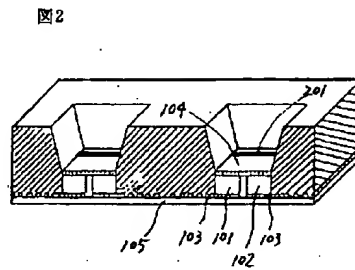
【符号の説明】

100…マイクロチャンバプレートを用いた生化学反応装置、101、102…P型およびN型半導体、103…リード線、104…温度調節プレート、105…定温度接点、201…熱電対部分、301…マイクロチャンバプレートの台、302…XYステージ、303…ピペッタ、304…マイクロチャンバプレートのふた

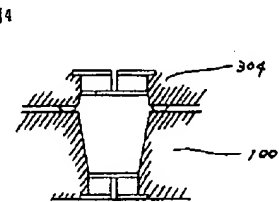
【図1】



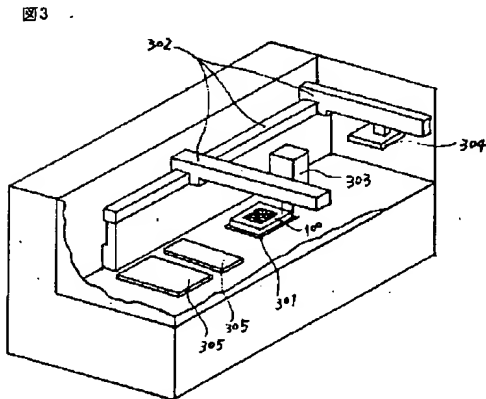
【図2】



【図4】



【図3】



* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] this invention relates to its usage, biological, the equipment with which a biochemical analysis is presented, for example, the micro multi chamber which performs the living body quantity molecular reaction represented by DNA and protein, and, and the manufacture method.

[0002]

[Description of the Prior Art] As a micro multi chamber which treats many biochemical samples simultaneously, there is a microwell test plate containing the so-called microtiter plate of 12 line x8 train, and peripheral devices, such as a handling device which made specification the same, and an incubator, a centrifuge, are also put in practical use by this. As a microfiltration tray designed so that it might have a demarcation membrane and a functional film as a reactor on a microwell test plate, it is provisional publication of a patent. There are some which offer the equipment of throwing away aiming at immunological investigation, a micro chromatograph, etc. so that common [2-187110] may see.

[0003] However, it is thought that the microtiter plate put in practical use now cannot but be the container which only holds a sample, and it is very difficult to control a reaction condition independently for every well also about a microfiltration tray, and it is impossible to perform especially temperature control independently.

[0004] Capacity is the chamber of the size of 10micro order which is 1-1ml, and the microtiter plate marketed now is not suitable for performing temperature control at dealing with the sample of the charge of microscopic, or high speed further again.

[0005] On the other hand, as a micro chamber treating the sample of a ultralow volume, particle processor and cell processor" is in "the equipment and the method" for sorting out a cell of JP,2-34597,B, "micro chamber plate of the publication number -131569 [No.], and the particle distinguishing method row. Although the method about impressing voltage to each chamber independently etc. and equipment are offered by the electrode which these offered the micro chamber treating the size of a cell piece, and was incorporated according to the semiconductor process, it is thought that it cannot be called an optimum for performing the living body quantity molecular reaction represented by DNA and protein for the purpose of both mainly dealing with a cell.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] The main things of a biochemical reaction are separation, refining, churning mixture, and incubation (reaction temperature maintenance), and if these can be simultaneously processed to 103-104 order, it will be thought that the throughput of the present biochemical work improves by leaps and bounds. For example, although various genes related to the present canceration and the variation part of those are being identified and the number has also amounted to hundreds of kinds, if these parts can be inspected and detected simultaneously, the precision and the throughput of a diagnosis will improve greatly. Moreover, in a gene analysis, when performing screening of the gene library exceeding 10000 clones etc., it is desirable to have located in a line at least 1000 or more chambers on one plate. On the other hand, when investigating part specific manifestation mechanisms, such as a medical diagnosis and a tumor cell, when it thinks from the point of the amount of the sample sample which can be prepared, while it is a large number, it is necessary to deal with the sample of a minute amount. [0007] Moreover, inn invented in recent years The nucleic-acid amplification reaction (PCR method) in VITORO (In vitro) makes possible the various new diagnostic technique and the experiment technique by the temperature control of reaction mixture, consequently is an inn in the research work of biochemistry. The range which can be performed by VITORO has been carrying out remarkable expansion. In this case, the uniform and high-speed temperature-control technology of the whole reaction mixture becomes important.

[0008] Therefore, the purpose of this invention offers the equipment to which the reaction sample of a minute amount may be made to react by sufficient concentration first. Moreover, it is in offering the equipment which enabled it to perform the temperature control of reaction mixture more quickly and uniformly.

[0009] Furthermore, other purposes of this invention offer an example of offering the equipment which makes it possible to make it possible to deal with many biochemical samples simultaneously, and to set up a reaction condition independently about each sample if needed, and the new protocol which becomes possible with this equipment in addition by using the chamber itself as an active reactor.

[0010] Moreover, in order to prevent the mixed contamination (contamination) which has sometimes fatal influence, as for the reactor of biochemistry, it is desirable that it is possible (disposable type) in throwing away. Then, it is also the purpose of this invention to make mass production method possible and to offer a disposable type reactor.

[0011]

[Means for Solving the Problem] In order to attain the above-mentioned purpose, each chamber is minutely turned below into the capacity of 0.5microl, and it enabled it to deal with a slight quantity of reaction mixture efficiently.

[0012] Moreover, the heater and condensator which are formed of the Pelletier element for every chamber are formed, and it enabled it to perform the temperature control of reaction mixture by contacting direct-reaction liquid to the heater and condensator.

[0013] In addition, mass production method was made possible by using a semiconductor process for processing of a chamber.

[0014]

[Function] By turning a chamber minutely and enabling it to treat a slight quantity of reaction mixture, it becomes possible to make the reaction sample of a minute amount react by sufficient concentration. For example, if it is made to react in the reaction mixture of 0.5microl, in order to perform the case of the reaction mixture of 100microl, and the reaction of this concentration, if it says conversely, concentration will become [the sample of 1/200 of amounts] that what is necessary is just to be 200 times by the same quantity of the sample. This will lessen not only minute-amount-izing of a reaction start sample but the amount used, such as an enzyme, and is considered to lead also to low-cost-ization.

[0015] Moreover, it becomes possible by attaching a heater and a condensator for every chamber in addition to minute-amount-izing of reaction mixture, and contacting direct-reaction liquid to the heater and condensator to carry out the temperature control of the reaction mixture independently for every reaction chamber, and to perform the temperature control quickly. A temperature control (element also with same heating and cooling) becomes independently possible by forming the semiconductor Pelletier element which consists of PNPN-- to a field with a front face, wiring independently of each pel TIE, and controlling addition voltage by using a chamber base material as silicon, after digging the hole of the suitable volume which serves as a chamber by anisotropic etching. Moreover, after processing in all chambers is completed, it is also possible by oxidizing the circumference of a chamber to make a chamber into the structure surrounded by the low SiO₂ of thermal conductivity.

[0016] Thus, in the made chamber, the endothermic of the Pelletier element and 0.15W /of limitations of calorific value are estimated about [0.18W //mm] at two mm at the time of 2 and generation of heat at the time of an endothermic. In this condition, if speed of the temperature change for controlling a start and end of an enzyme reaction with a sufficient precision is carried out to more than delta25 degrees C /, and sec, the depth needs to be 1.4mm or less at the maximum.

[0017] On the other hand, judging from the size of the silicon wafer which is easy to go into a miniaturization and hand of equipment, and the ease of processing or handling, it is thought that the area which gives chamber processing has the good square configuration array of the size not more than 80mmx80mm. Like point **, when using for future gene diagnosis and a future gene analysis, it is desirable to have located at least 1000 chambers in a line on one wafer. In this case, in order to arrange 1000 chambers in the pitch same 80mmx80mm in the shape of a square as one side of a chamber, it is needed that one side of a chamber is 1.2mm or less.

[0018] By the way, when processing a silicon wafer by anisotropic etching and an opening configuration is made into a square, the angle which a hole configuration becomes square drill-like and the base and side make is about 50 degrees. In this configuration, if it is referred to as 420 micrometers to which a man ootid (diameter of about 200 micrometers) can treat the depth and opening is made into a 1.2mmx1.2mm square, the base which forms the Pelletier element will serve as the shape of a 0.6mmx0.6mm square. Thus, in the made chamber, although the endothermic and calorific value of the Pelletier element are estimated at about 0.06W at the time of 0.05W and generation of heat at the time of an endothermic, in the case of the above opening 1.2mmx1.2mm and 0.42mm depth, volume is set to a maximum of 0.35microl, and satisfies delta25 degree C/sec. However, since solution temperature was adjusted by equipping a thermostat with the reaction tube into which reaction mixture was put, although the thermal resistance of a tube, the heat contact between a tube and a heater, etc. had become a problem, if heating or the condensator is in contact with direct-reaction liquid like this invention, effective temperature control is possible for the conventional thermoregulator.

[0019] Also in the point of mixed churning, if reaction mixture is a minute amount, the effect of diffusion will become large. Since the speed of diffusion is in volume and proportionality about, in the reaction mixture of 0.5microl, it is thought that random mixture progresses by one 200 times the speed of this compared with the case of 200microl. The diffusion effect can also be promoted by adding very small vibration of a RF to the whole chamber. What is necessary is just to take the method of building vibrator or a rotator by three-dimensions micro processing in a chamber, when it cannot be said that just this is enough. For example, although the equipment which vibrates a silicon thin film by sagging the silicon board made thin by the electrostatic force, and controlling the electrostatic force is also realized, it is possible to use this structure. Moreover, it is also possible to put in order and make many electrostatic motors on a silicon wafer.

[0020] It is possible by building these heating and a cooling element, and a churning element for every chamber according to a semiconductor process to offer the micro chamber equipment with which many reactors were arranged on the flat surface. And since it is easy to process many micro chambers simultaneously according to the semiconductor process, it also becomes possible to make equipment itself disposable.

[0021] By using such equipment, the new experiment technique which made reaction temperature and reaction time the parameter becomes possible. For example, in performing the PCR method, three kinds of temperature, denaturation temperature, reassociation temperature, and extension temperature, and the holding times determine the efficiency (depending on the case, it is the existence of a generation product) of a reaction. If this equipment which controls setting temperature by minute amount-ization of reaction mixture with a sufficient precision, and an independent temperature control can perform for every

reaction mixture is used, it is possible to react simultaneously at different setting temperature to the same reaction mixture, and to acquire the product in the optimal experiment conditions quickly. Moreover, it does not come out so much and it also becomes possible using the point mutation under DNA array etc. influencing the optimal reassociation temperature sensitively to perform gene diagnosis etc. to accuracy efficiently more. In addition, it is also possible by controlling the extension time by DNA polymerase with sufficient resolution by this equipment to raise the singularity of a resultant.

[0022]

[Example] Hereafter, drawing 1 - drawing 4 explain one example of this invention. Drawing 1, the biochemical-reaction equipment with which 2 used the micro chamber of this invention, and drawing 3 are automatic sample preparation equipment which incorporated the above-mentioned equipment as an element. Moreover, in drawing 1 - drawing 4, the number of an intersection presupposed that it is the same.

[0023] In drawing 1, the base material of equipment is silicon, and after digging the hole of the suitable volume which serves as a chamber by anisotropic etching, the semiconductor Pelletier element which consists of 101-105 is formed in the base. The P type which formed 101 and 102 by the diffusion method (semiconductor process) and an N-type semiconductor, and 103 are lead wire and the degree contact of constant temperature with 104 [common / a heater and a cooling plate (** tone plate), and 105 / to all wells]. The temperature of the ** tone plate shown in 104 is independently controllable for every well by controlling the degree contact 105 of constant temperature to suitable temperature, and applying voltage required for the ends of lead wire 103.

Moreover, if voltage is not applied to lead wire but the potential difference of ends is measured, it is also possible to use this Pelletier element as a thermocouple for thermometry. It is also possible to form separately a part for a temperature control part 104 and the thermocouple portion 201 at the time of well processing, as shown in drawing 2 depending on the case. In this example, a base is set [the size of a well] to 0.6mm by 0.6mm from the property of a depth of 0.42mm, and the silicon crystal face by opening by 1.2mm by 1.2mm, and the capacity of a well is set to a maximum of 0.35microl.

[0024] Although the copper electrode of the Pelletier element is used as it is as a **** plate 104, when the influence to the reaction mixture of a copper electrode is important, it is coped with by covering this electrode top by the ceramic aluminum plate, the thermally conductive good polymer, etc.

[0025] Moreover, the circumference of a well serves as SiO₂ which oxidized, and the effect of heat insulation becomes large compared with the silicon of a base material.

[0026] Drawing 3 is the bird's-eye view of the automatic sample preparation equipment incorporating the chamber plate shown in drawing 1. The reactor 100 using the micro chamber plate is fixed to a base 301. The base 301 consists of thermoregulators for the temperature control of the socket of the electrode of a chamber plate, and the degree contact of constant temperature. In order to heighten the effect of diffusion in a well, it can also be made structure to which vibration of a RF is given by the chamber plate.

[0027] 302 is an X-Y stage which conveys the cover 304 of a pipeter 303 and a micro chamber plate. It is possible for a pipeter 303 to have a pipet using the micro capillary which can pour the sub microliter distributively, and to pour the reagent and sample of a ultralow volume distributively with a sufficient precision. This pipeter supplies reaction mixture in a well, going back and forth between the solution preservation container 305 and reactors 100. There is also a method of using not a pipet but the mere needle points, such as a capillary, in supply of the reagent of a super-ultralow volume. That is, the reagent which has wet the front face of the needle point dipped in the reagent without a part for a centrum is diffused in reaction mixture by contacting the needle point to reaction mixture. Sample supply of a super-ultralow volume is attained by controlling the concentration and the wetted area of a reagent.

[0028] A cover 304 processes a shallow slot into the same position array as a micro chamber, and forms the Pelletier element in the upper surface. Except the time of distributive pouring, this cover 304 is pushed so that a slot may be so much in agreement with a well (drawing 4), and it is controlled by temperature higher slightly (2-3 degrees C) than the reaction mixture of each well. It is possible to prevent evaporation of the microreaction liquid in a well by this.

[0029] It is thought that this automatic sample preparation equipment can constitute the biochemical-reaction equipment of small extensive processing very much separative elements, such as an isolation film, and by combining with the reagent supply element of varieties etc. further. Moreover, it thinks [that the chamber plate which contains a churning element and a separative element in a well is also realizable with progress of future three-dimensions ultra-fine processing technology, and].

[0030] In this specification, although the micro chamber plate which mainly has the capacity below 1microl has been described, it is the range which is the critical item of this invention and in which this invention also contains the reactor which the size of a chamber does not receive a limit and built the above reaction elements into the so-called microtiter plate of 12 line x8 train about the reactor with which each chamber has the controllable temperature control function in which it became independent, and churning and isolation.

[0031]

[Effect of the Invention] According to this invention, it becomes possible to process the sample of a ultralow volume simultaneously by various reaction conditions. By this, optimization of a biochemical reaction which makes the sample of the ultralow volume which was not able to be treated conventionally a start sample, and high throughput-ization are realized, and it can contribute to development of the field of a gene analysis or gene diagnosis.

[0032] Moreover, combination with a peripheral device realizes the miniaturization of a biochemical-reaction automatic gear.